

# 响应面法优化超声辅助提取紫色小白菜花青苷的工艺研究

杨碧云<sup>a,b</sup>, 叶丽萍<sup>a,b</sup>, 林琳琳<sup>a,b</sup>, 汪镇坤<sup>a</sup>, 邹伟明<sup>a</sup>, 曾晓兰<sup>a</sup>, 钟凤林<sup>a,b\*</sup>,  
林义章<sup>a,b\*</sup>

(福建农林大学, a. 园艺学院; b. 蔬菜研究所, 福州 350002)

**摘要:** 为探讨从紫色小白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino var. *communis* Tsen et Lee)叶片中提取花青苷的最佳工艺条件,在超声功率为 420 W、40%乙醇和两次超声提取条件下,采用 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理,设计 4 因素 3 水平试验,研究了 pH、料液比、超声温度、超声时间对花青苷得率的影响。结果表明,紫色小白菜叶片花青苷提取的优化工艺参数为料液比 1 : 16 (pH 2.76),在超声功率为 420 W、温度为 58℃下超声 12 min,花青苷的提取得率可达 4.11 mg g<sup>-1</sup> DW。

**关键词:** 紫色小白菜; 花青苷; 超声波; 提取工艺; 响应面法

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2014.04.008

## Ultrasonic Condition Optimization for Anthocyanin Extraction from Purple Cabbage by Using Response Surface Methodology (RSM)

YANG Bi-yun<sup>a,b</sup>, YE Li-ping<sup>a,b</sup>, LIN Lin-lin<sup>a,b</sup>, WANG Zhen-kun<sup>a</sup>, ZOU Wei-ming<sup>a</sup>, ZENG Xiao-lan<sup>a</sup>,  
ZHONG Feng-lin<sup>a,b\*</sup>, LIN Yi-zhang<sup>a,b\*</sup>

(a. College of Horticulture; b. Vegetable Research Institute, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** The aim was to optimize the ultrasonic extraction method for anthocyanins from purple cabbage [*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino var. *communis* Tsen et Lee] leaves. Under the conditions of 420 W ultrasonic power, 40% ethanol and twice extraction, the interactive effects of four crucial parameters, including pH, ratio of solid to liquid, ultrasonic time and ultrasonic temperature, were studied by central composite (Box-Behnken) and response surface methodology (RSM). The results showed that the optimum process for anthocyanin extraction was 1:16 of solid to liquid with pH 2.76 extracted at 58℃ for 12 min under 420 W ultrasonic power. Under this condition, the extract yield of anthocyanins from purple cabbage leaves reached up to 4.11 mg g<sup>-1</sup> DW.

**Key words:** Purple cabbage; Anthocyanins; Ultrasonic; Extract; Response surface methodology

小白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* Makino)为十字花科(Cruciferae)芸薹属白菜种的亚种,是我国南北广泛栽培的蔬菜之一<sup>[1]</sup>。紫色小白菜[*B. campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino var.

*communis* Tsen et Lee]是小白菜的变种,具有易种植、易采摘的特点,且叶片正面紫色,富含花青苷,营养价值高,深受消费者的喜爱。花青苷具有较强的抗氧化作用,具有延缓衰老、降低胆固醇、降血

收稿日期: 2013-12-31 接受日期: 2014-03-30

基金项目: 福建省大宗蔬菜产业体系项目(2012K83139294);福建省自然科学基金项目(2012J01082);福建农林大学校重点建设项目(6112c0409)资助

作者简介: 杨碧云(1989~),女,硕士研究生,主要从事蔬菜生理生化研究。E-mail: yangbiyun2010@126.com

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mails: ZFL10305@126.com; lyz2003007@163.com

脂、护肝、抗肿瘤、抗癌、抗过敏等作用,并有很好的调色作用<sup>[2-6]</sup>。因此花青苷的研究越来越受到人们的重视。

超声波作为一种辅助提取手段主要应用于中草药的化学成分、植物油、多酚、芳香成分、多糖的提取等领域。超声波可通过产生空化作用和次级效应,使细胞周围和细胞内产生环流,从而提高细胞壁和细胞膜的通透性,有利于细胞内有效成分的释放,明显缩短提取的时间<sup>[7-8]</sup>。目前,国内外众多科研工作者对采用超声辅助技术提取花青苷进行了研究,如采用超声辅助技术提取了紫甘蓝(*B. oleracea* var. *capitata*)<sup>[7]</sup>、苋菜(*Amaranthus mangostanus*)<sup>[9]</sup>、紫甘薯(*Ipomoea batatas*)<sup>[10-11]</sup>、紫苏(*Perilla frutescens*)<sup>[12]</sup>、黑胡萝卜(*Daucus carota* ssp. *sativus*)<sup>[13]</sup>等中的花青苷。响应面设计法是采用多元二次回归方程,拟合试验中多个因子与响应值间的关系,估计回归方程的系数,通过对方程求极值来达到参数优化的目的,从而解决受多种因素影响的最优组合问题。与过去的正交设计法不同,由于其具有更合理的设计和更优良的结果,在化学工业、生物学、医学、食品学、工程学、生态学等领域得到了广泛应用<sup>[14-17]</sup>,尤其在天然产物的提取优化,如总黄酮<sup>[17-19]</sup>、多糖<sup>[20-21]</sup>、蛋白质<sup>[22]</sup>的提取都获得了具有实用价值的最佳优化工艺条件。

目前,对紫色小白菜的研究主要集中于杂交育种和栽培管理方面<sup>[23-24]</sup>,而对其花青苷的提取研究仅见浸提法<sup>[25]</sup>,尚未见利用超声辅助提取法的报道。本研究利用超声波对紫色小白菜花青苷进行提取研究,并通过响应面分析法使优化其工艺,旨在探究紫色小白菜花青苷的超声辅助提取的最优工艺条件,从而建立一个实用的模型,为深入研究及推广紫色小白菜的产业化开发提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

紫色小白菜[*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino var. *communis* Tsen et Lee]于2013年9-11月种植于福建农林大学,播种45 d后采收叶片,去掉叶脉,叶肉经冷冻干燥,粉碎后过40目筛,保存于-80℃冰箱内备用。

### 1.2 试剂及仪器

冰醋酸、丙酮、无水乙醇、浓盐酸、氢氧化钠、甲醇均为分析纯试剂。FW200型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)、低温离心机(Thermo D-37520 Osterode, 德国)、TU-1810紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)、KQ-600DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、AKWL-IV-50艾柯超纯水系统(成都康氏康宁科技发展有限公司)、BS214D电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)、LGJ-S24型冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂有限公司)、奥立龙Model868型酸度计(北京长风仪器仪表公司)。

### 1.3 花青苷的提取和含量测定

将紫色小白菜叶片冻干粉末按1:5料液比用酸化乙醇溶液(乙酸:乙醇:水=5:40:55)溶解,在功率为420 W,温度为50℃条件下超声波辅助提取30 min,在4000×g下离心10 min,吸取上清液稀释30倍,以酸化乙醇水溶液为对照,1 mL比色皿的溶液用紫外分光光度计在195~650 nm范围内进行光谱扫描<sup>[25]</sup>。参照Wrolstad法<sup>[26]</sup>进行花青苷含量的测定。

### 1.4 提取工艺单因素优化试验

紫色小白菜叶片冻干粉末分别对乙醇浓度、pH值、超声功率、料液比、时间、温度和提取次数等单因素进行优化,各因素水平设计见表1。

### 1.5 响应面法设计试验

在单因素试验的基础上,利用响应面法确定影响水平,根据Box-Behnken的中心组合试验设计,固定浸提溶剂,设计4因素3水平的响应面分析试验(表2)。试验数据使用Design-Expert 8.0软件进行分析,得到响应面分析图和方差分析表,确定紫色小白菜花色素苷提取的最佳条件。采用响应面试验确定的优化条件对紫色小白菜花青苷提取工艺进行验证。

### 1.6 数据处理

采用Excel 2003、Design-Expert 8.0和Origin 9.0软件进行数据分析及作图,并用DPS V3.01进行单因素方差分析,LSD检验法进行多重比较, $P<0.05$ 表示差异显著。

表 1 单因素试验设计

Table 1 Design of single factor experiment

因素 Factor	水平 Level
乙醇 Ethanol(%)	0、20、30、40、50、60、70
pH	0.5、1、2、3、4
超声功率 Ultrasonic power (W)	240、300、360、420、480、540
料液比 Ratio of solid to liquid	1 : 5、1 : 10、1 : 15、1 : 20、1 : 25、1 : 30
超声时间 Ultrasonic time (min)	5、10、20、30、40、50
超声温度 Ultrasonic temperature (°C)	30、40、50、60、70
提取次数 Extraction times	1、2、3、4

表 2 响应面试验因素水平

Table 2 Factors in RSM experiment

因素 Factor	编码 No.	水平 Level		
		-1	0	1
料液比 Ratio of solid to liquid	A	1 : 10	1 : 15	1 : 20
超声时间 Ultrasonic time (min)	B	5	10	15
超声温度 Ultrasonic temperature (°C)	C	50	60	70
pH	D	2	3	4

## 2 结果和分析

### 2.1 紫色小白菜花青苷的光谱特性

由图 1 可知,紫色小白菜的色素提取液在 335 nm 处有 1 个最大吸收峰,在 530 nm 处有 1 个侧峰,这是植物花青苷的特征吸收峰之一,由此判断紫色小白菜的紫色提取液主要成分属于花青苷类色素。本试验以该波长作为测定紫色小白菜的花青苷质量浓度的特征谱<sup>[27]</sup>。

### 2.2 单因素试验

通过对乙醇浓度、pH、超声功率、料液比、超

声时间、温度和提取次数等因素进行试验,结果表明,乙醇浓度为 40%, pH 为 3, 超声功率 420 W, 料液比为 1 : 15, 在 60 °C 下超声 10 min 是单因素试验的最佳结果。从图 2 可见,随乙醇浓度升高,紫色小白菜花青苷的提取得率先逐渐提高,乙醇浓度为 40% 时的得率最高,然后不断下降。随超声功率的升高,提取得率呈现先提高后快速下降的趋势,表明在超声功率较小时,细胞不能受到超声波充分的作用,而当超声功率过大则会加速提取液的流动,破壁作用随之减弱,使胞内花青苷溶出速率减缓。随料液比的升高,提取得率呈现先提高后快速下降的趋势,说明若溶剂太少,会导致超声波在

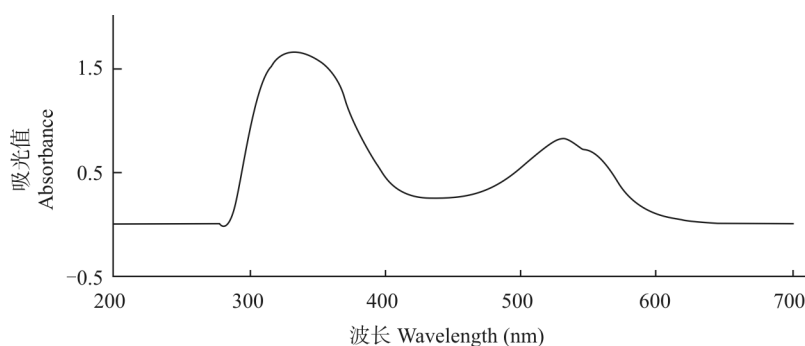


图 1 紫色小白菜花青苷的吸光光谱

Fig. 1 Absorbance of anthocyanin from purple cabbage

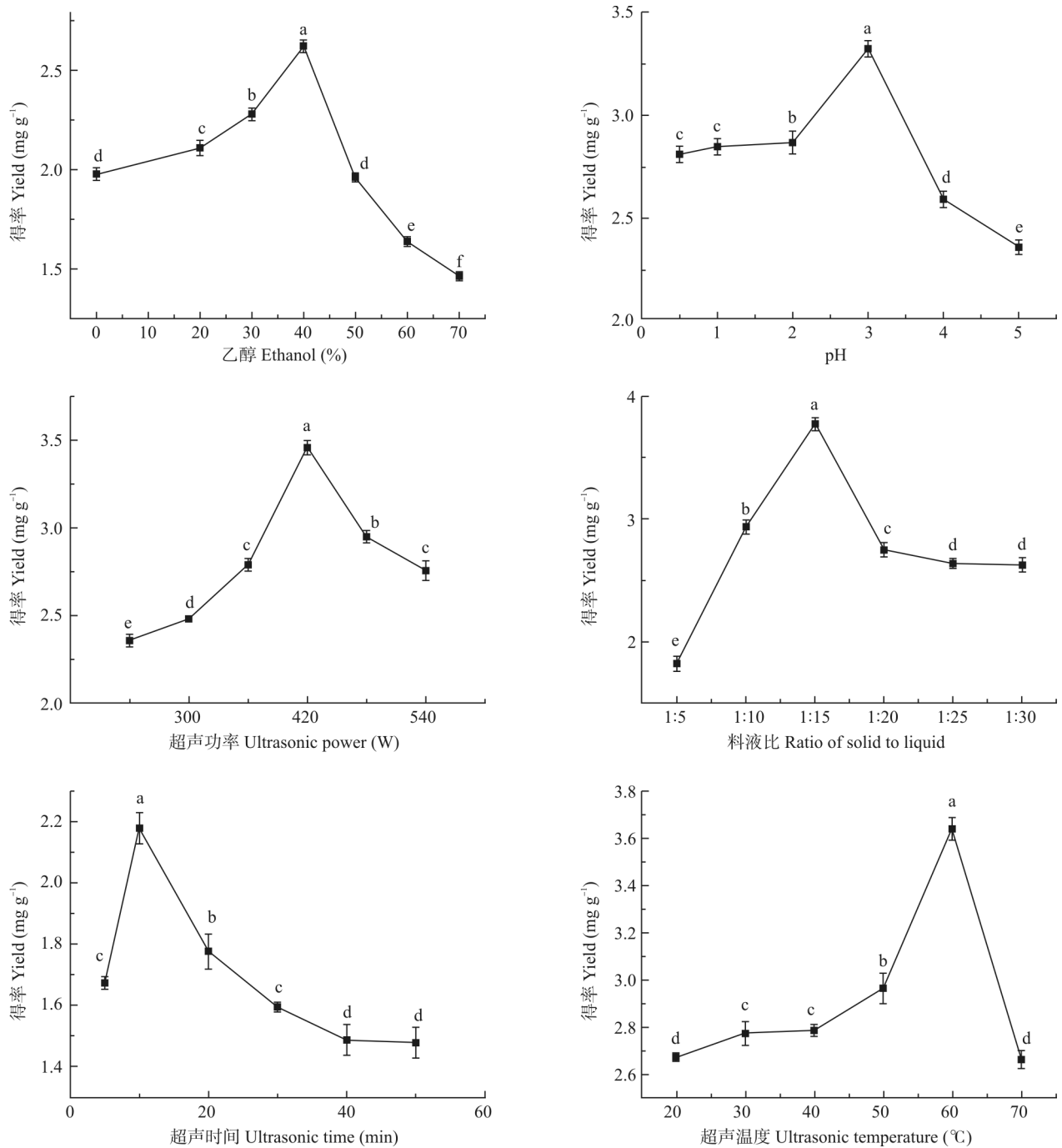


图2 单因素对花青苷提取得率的影响。不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Fig. 2 Effects of factors on anthocyanin yield. Different letters above line indicate significant difference at 0.05 level.

液相中的吸收大于固相,超过 1:15 后,由于色素被稀释,有机溶剂接触色素的机会减少而导致得率降低。随超声时间的延长,提取得率也呈现先提高后快速下降的趋势,以超声 10 min 的得率最高,达  $2.12 \text{ mg g}^{-1}$ ,这表明超声时间过短,紫色小白菜花青苷溶解不充分,而过长的超声波时间可能使花青苷发生降解作用,从而导致花青苷得率下降。花青苷

提取得率以 60°C 时最高,温度继续升高后提取得率出现快速下降,表明高温会造成花青苷的分解,影响其生物活性。

### 2.3 提取次数的影响

随着提取次数的增加花青苷的得率也相应地增加,第 1 次的花青苷提取得率为  $2.87 \text{ mg g}^{-1}$ ,第

2次达 3.63 mg g<sup>-1</sup>,而第3次(3.79 mg g<sup>-1</sup>)和第4次(3.95 mg g<sup>-1</sup>)的提取得率变化不大,说明提取次数超过2次后对得率的影响不大,从能耗、时间以及提取剂的经济角度来看,已没有多少实际意义,故提取次数以2次为佳。

2.4 响应面法优化

**响应面试验结果及回归分析** 为研究各工艺参数之间的交互作用对紫色小白菜花青苷得率的影响,选用中心复合模型,采用4因素3水平共29个试验点(5个中心点用以估计试验误差)的响应面分析试验,按表3的顺序进行试验,将所得的

数据用 Design-Expert 8.0 软件进行分析,以料液比(A)、时间(B)、温度(C)和 pH (D)为自变量,以花青苷的得率(mg g<sup>-1</sup>)为响应值,经回归拟合得到二次回归方程: $Y = 4.17 + 0.047A + 0.037B - 0.12C - 0.18D + 0.071AB - 0.031AC - 0.021AD - 0.14BC - 0.11BD + 0.049CD - 0.21A^2 - 0.16B^2 - 0.42C^2 - 0.48D^2 + 0.11A^2B$ 。

方程中各项系数绝对值的大小直接反映了各因素对指标值的影响程度,系数的正负反映了影响的方向。由此得出最佳提取工艺条件为:料液比为 1 : 16,超声时间为 11.86 min,超声温度为 57.66℃,pH 为 2.76。

利用 Design-Expert 8.0 软件对紫色小白菜花

表3 中心组合试验设计及结果

Table 3 Design and results of central composite test

编号 No.	因素 Factor				得率 Yield (mg g <sup>-1</sup> )	预测值 Predicted value (mg g <sup>-1</sup> )	编号 No.	因素 Factor				得率 Yield (mg g <sup>-1</sup> )	预测值 Predicted value (mg g <sup>-1</sup> )
	A	B	C	D				A	B	C	D		
1	10	5	60	3	3.71	3.67	16	15	15	70	3	3.20	3.36
2	20	5	60	3	3.60	3.63	17	10	10	50	3	3.51	3.58
3	10	15	60	3	3.86	3.82	18	20	10	50	3	3.76	3.74
4	20	15	60	3	4.03	4.06	19	10	10	70	3	3.41	3.40
5	15	10	50	2	3.55	3.62	20	20	10	70	3	3.54	3.44
6	15	10	70	2	3.31	3.28	21	15	5	60	2	3.61	3.56
7	15	10	50	4	3.16	3.17	22	15	15	60	2	3.97	3.84
8	15	10	70	4	3.11	3.02	23	15	5	60	4	3.32	3.42
9	10	10	60	2	3.54	3.59	24	15	15	60	4	3.25	3.27
10	20	10	60	2	3.64	3.72	25	15	10	60	3	4.12	4.17
11	10	10	60	4	3.31	3.27	26	15	10	60	3	4.10	4.17
12	20	10	60	4	3.33	3.33	27	15	10	60	3	4.32	4.17
13	15	5	50	3	3.63	3.52	28	15	10	60	3	4.13	4.17
14	15	15	50	3	3.92	3.89	29	15	10	60	3	4.16	4.17
15	15	5	70	3	3.49	3.57							

青苷提取的响应值进行回归分析,结果表明,一次项 C、D,交互项 B、C 以及二次项 A<sup>2</sup>、B<sup>2</sup>、C<sup>2</sup>、D<sup>2</sup> 对得率的影响均达极显著水平,表明试验因子对响应值不是简单的线性关系,二次项对响应值有很大的影响,这和模型回归中的线性和平方项影响显著项对应,在所选取的各因素水平范围内,对结果的影响依次为 pH > 温度 > 料液比 > 时间。失拟项(F=1.56)不显著,说明试验误差很小。回归方程的 F 值为 18.09, P<0.0001,达到极显著水平。相关系数 R<sup>2</sup>=0.9543,说明该回归方程拟合程度较好。

变异系数(CV=2.92%)<5%,说明模型的重现性较好<sup>[28]</sup>。这说明该回归模型是合理的,试验具有很高的可信度和准确性,可以用于紫色小白菜花青苷得率的预测。

**响应曲面与等高分析** 根据紫色小白菜花青苷得率的回归模型作出三维响应面图和等高曲线图(图 3~8),每个响应面对其中两个因素进行分析,另外两个因素固定在零水平。通过三维图与二维图,可以看出试验水平与每个变量或变量之间的交互影响的响应值之间的关系。等高线的形状(圆

表4 中心组合试验的方差分析

Table 4 ANOVA analysis of central composite test

来源 Source	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F	P > F
模型 Model	3.07	15	0.2	18.09	<0.0001**
A	0.027	1	0.027	2.38	0.1469
B	0.011	1	0.011	0.97	0.3435
C	0.18	1	0.18	15.66	0.0016**
D	0.38	1	0.38	33.31	<0.0001**
AB	0.02	1	0.02	1.79	0.2042
AC	$3.74 \times 10^{-3}$	1	$3.74 \times 10^{-3}$	0.33	0.5753
AD	$1.71 \times 10^{-3}$	1	$1.71 \times 10^{-3}$	0.15	0.7039
BC	0.084	1	0.084	7.39	0.0176*
BD	0.046	1	0.046	4.08	0.0645
CD	$9.45 \times 10^{-3}$	1	$9.45 \times 10^{-3}$	0.83	0.3776
A <sup>2</sup>	0.28	1	0.28	24.82	0.0003**
B <sup>2</sup>	0.18	1	0.18	15.50	0.0017**
C <sup>2</sup>	1.13	1	1.13	99.49	<0.0001**
D <sup>2</sup>	1.49	1	1.49	131.30	<0.0001**
A <sup>2</sup> B	0.03	1	0.03	2.68	0.1254
残差 Residual	0.15	13	0.011		
失拟项 Lack of fit	0.11	9	0.013	1.56	0.3541
误差 Error	0.033	4	$8.17 \times 10^{-3}$		
总和 Total	3.22	28			

 $R^2=0.9543$   $R_{adj}^2=0.9016$ 
\*\*: $P<0.01$ ; \*: $P<0.05$ .

形、椭圆形)反映变量之间的交互影响是否显著,圆形的等高线表明两变量之间的交互影响不显著。从图3~8可以看出,超声温度和时间的交互作用最显著,其它因素间的交互作用较小。结合表4的回归方差分析,料液比的变化坡度较超声时间的大(图3),且料液比的等高线变化数量多于超声时间的,说明料液比对紫色小白菜花青苷得率的影响大于超声时间;同理,温度对花青苷得率的影响大于料液比(图4);pH值对花青苷得率的影响大于料液比(图5);温度对花青苷得率的影响大于超声时间(图6);pH值对花青苷得率的影响大于超声时间(图7);pH值对花青苷得率的影响大于温度(图8)。

根据响应面试验所得的优化提取工艺进行验证试验,准确称取0.5 g干燥的紫色小白菜叶片粉末,以料液比1:16加入0.05% HCl-40%乙醇8 mL,调节pH为2.76,在58℃下以420 W的超声功率提取12 min,提取次数2次。重复试验3次,花

青苷的平均得率为 $4.1102 \text{ mg g}^{-1}$ ,与模型预测值( $4.2133 \text{ mg g}^{-1}$ )的相对误差仅为2.5%,说明此模型有效,采用响应面法得到的紫色小白菜花青苷提取工艺参数可靠,重现性好,具有实用价值。

### 3 结论和讨论

本研究利用超声波辅助提取方法,在单因素试验的基础上,采用4因素3水平的响应面分析法,针对超声时间、温度、料液比等因素进行了工艺条件优化,通过回归模型进行参数优化,确定最佳工艺的提取条件为:料液比为1:16 (pH 2.76),在58℃下超声提取12 min。在此条件下紫色小白菜花青苷的提取得率可达 $4.11 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ ,从而建立了其优化条件的数学回归模型,并分析了各因子对响应值的影响,本试验结果表明,模型拟合程度高,试验误差小,可用于实际预测,是一个实用的、

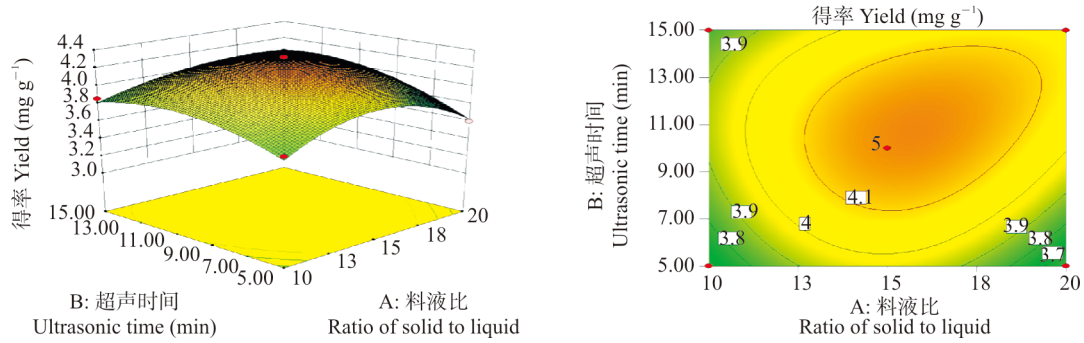


图 3 料液比和超声时间交互影响的响应面图和等高线图

Fig. 3 Contour map and response surface graph of interaction effects between ratio of solid to liquid and ultrasonic time

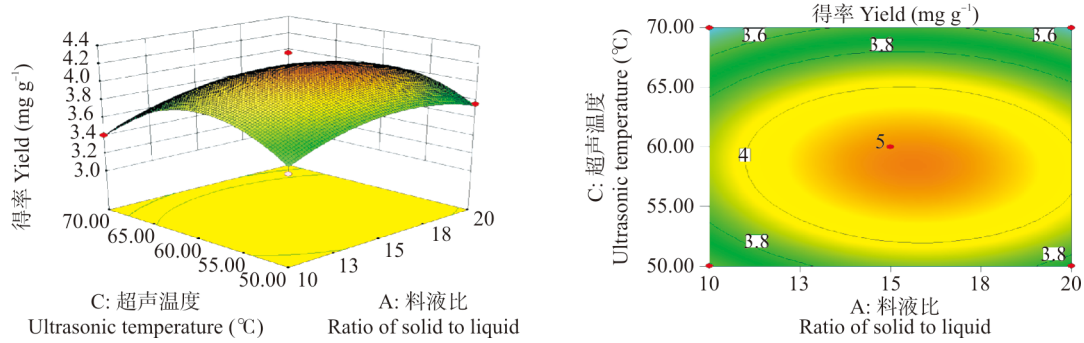


图 4 料液比和超声温度交互影响的响应面图和等高线图

Fig. 4 Contour map and response surface graph of interaction effects between ratio of solid to liquid and ultrasonic temperature

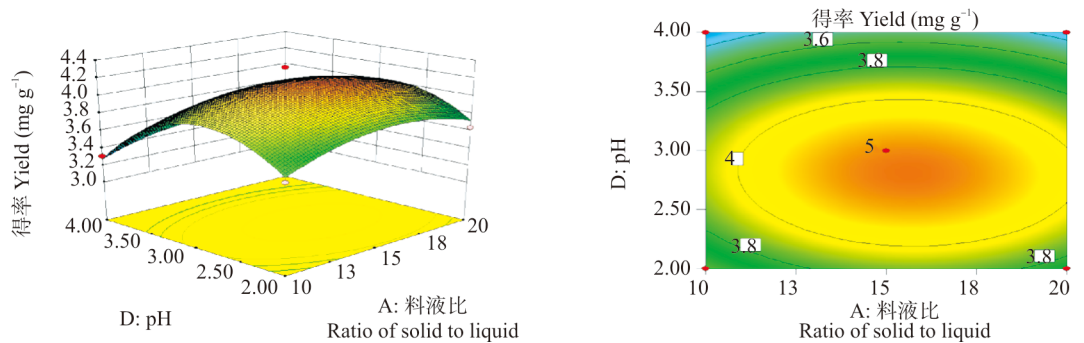


图 5 料液比和 pH 交互影响的响应面图和等高线图

Fig. 5 Contour map and response surface graph of interaction effects between ratio of solid to liquid and pH

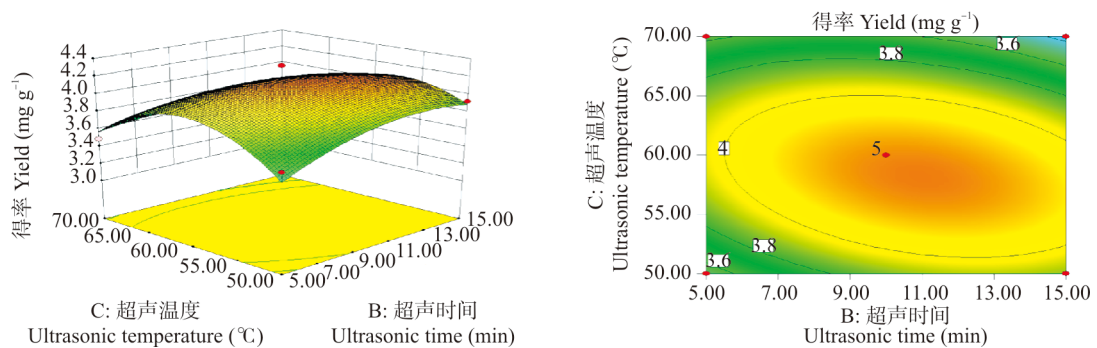


图 6 超声时间和超声温度交互影响的响应面图和等高线图

Fig. 6 Contour map and response surface graph of interaction effects between ultrasonic time and temperature

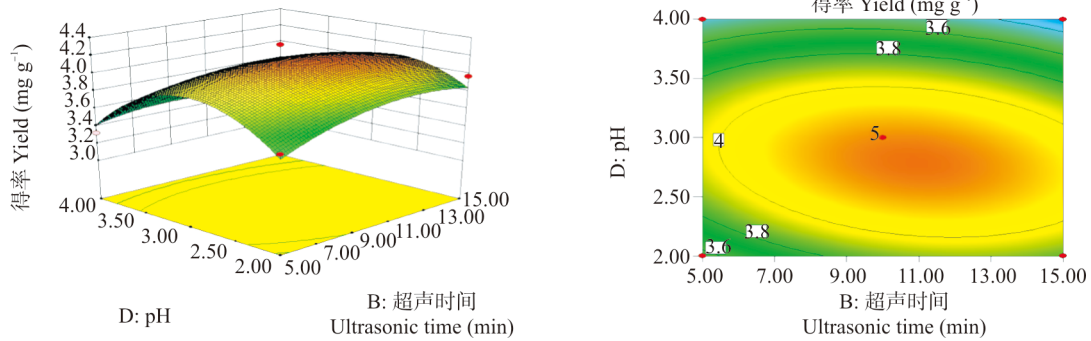


图7 超声时间和 pH 交互影响的响应面图和等高线图

Fig. 7 Contour map and response surface graph of interaction effects between ultrasonic time and pH

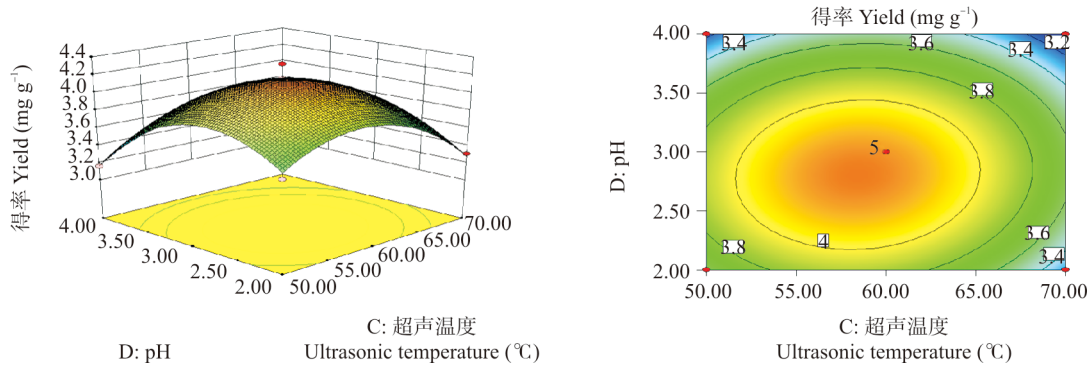


图8 超声温度和 pH 交互影响的响应面图和等高线图

Fig. 8 Contour map and response surface graph of interaction effects between ultrasonic temperature and pH

易于操作的提取方法。

近年来,对于花青素提取方法的研究是较为活跃的领域,有关的研究报道较多,一些新的提取方法,如微波、超声波、超高压等都得到了应用<sup>[8]</sup>。超声波辅助提取植物花青苷具有简单、高效、成本低等特点,且其提取效果和超声作用时间、强度、频率及所用溶剂及样品种类等有关<sup>[29]</sup>。响应面法可以在更广泛的范围内考虑因素的组合,并对响应值进行预测,从而得到更可靠的优化工艺条件。周丹蓉<sup>[17]</sup>对枇杷(*Eriobotrya japonica*)花的总黄酮、石恩慧<sup>[30]</sup>对板栗(*Castanea mollissima*)总苞的多酚物质、王伟<sup>[31]</sup>对桑树(*Fructus mori*)的桑葚色素提取工艺条件进行了优化,都证明利用响应面分析法和超声辅助技术体系具有较高的效率、优越性及巨大的发展潜力。本试验利用响应面法对紫色小白菜花青苷提取工艺进行了优化,建立了紫色小白菜花青苷提取的技术体系,这将为研究紫色小白菜等紫色叶菜类的外观品质提供一个良好的技术平台,还为紫色小白菜花青苷的产业化开发提供参考。

## 参考文献

- [1] Zhou T Y. *Florae Reipublicae Popularis Sinicae*, Tomus 33 [M]. Beijing: Science Press, 1987: 42–43.  
周太炎. 中国植物志, 第33卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1987: 42–43.
- [2] Li J J. The advancement of anthocyanins [J]. *J Grad Sun Yat-Sen Univ (Nat Sci Med)*, 2007, 28(2): 1–5.  
李娟娟. 花青素研究进展 [J]. 中山大学研究生学刊: 自然科学医学版, 2007, 28(2): 1–5.
- [3] Yang X J, Zhao X Y, Ma Y, et al. The advancement of anthocyanins [J]. *China Food Add*, 2005(4): 40–42.  
杨秀娟, 赵晓燕, 马越, 等. 花青素研究进展 [J]. 中国食品添加剂, 2005(4): 40–42.
- [4] Liu L W. *Food Chemistry* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1998: 51–53.  
刘邻渭. 食品化学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 51–53.
- [5] Zhao X. Research on extraction, purification and reducing blood-fat of natural anthocyanin [D]. Heilongjiang: Northeast Forestry University, 2005: 4–7.  
赵鑫. 天然花青苷提取纯化及降血脂作用的研究 [D]. 黑龙江: 东北林业大学, 2005: 4–7.
- [6] Li Z D, Xin X R, Cong P J, et al. Purple cabbage — Pak Choy,



- Horti-Violet [J]. *China Veget*, 2011(11): 35.
- 李正德, 辛学锐, 丛培军, 等. 紫色小白菜——好地紫罗兰 [J]. *中国蔬菜*, 2011(11): 35.
- [7] Lei X Y. Study of technics of extracting pigment from purple cabbage with ultrasonic aiding [J]. *J Shenyang Chem Univ*, 2012, 26(2): 127–130.
- 雷晓燕. 超声波辅助提取紫甘蓝色素的工艺研究 [J]. *沈阳化工大学学报*, 2012, 26(2): 127–130.
- [8] Sun J X, Zhang Y, Hu X S, et al. Review on the methods of extraction, isolation and purification of anthocyanins [J]. *Food Ferment Inds*, 2008, 34(8): 111–117.
- 孙建霞, 张燕, 胡小松, 等. 花青素的提取、分离以及纯化方法研究进展 [J]. *食品与发酵工业*, 2008, 34(8): 111–117.
- [9] Wang N, Jia J Z, Sun T J, et al. Optimization of the preparation process for red pigment and green pigment of amaranth [J]. *J Shanxi Med Univ*, 2007, 38(7): 650–653.
- 王宁, 贾珺璋, 孙体健, 等. 超声波法提取苋菜中红、绿色素的工艺研究 [J]. *山西医科大学学报*, 2007, 38(7): 650–653.
- [10] Xu Q L, Xing Y G, Che Z M, et al. Optimized research on the extracted technology of anthocyanin from purple sweet potato by ultrasonic [J]. *Food Ind*, 2013, 34(4): 97–99.
- 许青莲, 邢亚阁, 车振明, 等. 超声波提取紫薯花青素工艺条件优化研究 [J]. *食品工业*, 2013, 34(4): 97–99.
- [11] Fan G, Han Y, Gu Z, et al. Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM) [J]. *Lwt-Food Sci Techn*, 2008, 41(1): 155–160.
- [12] Hu X D, Sun A D, Wang C X, et al. Study on extraction of anthocyanins from *Perilla* leaves by ultrasonic assisted extraction [J]. *Food Ind Sci Techn*, 2008, 29(6): 183–185.
- 胡晓丹, 孙爱东, 王彩霞, 等. 超声波辅助提取紫苏叶中花色素苷的工艺研究 [J]. *食品工业科技*, 2008, 29(6): 183–185.
- [13] Kırca A, Özkan M, Cemeroğlu B. Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins [J]. *Food Chem*, 2007, 101(1): 212–218.
- [14] Hao X C, Yu X B, Liu Z Y, et al. The application of response surface methodology in optimization of microbial media [J]. *Food Res Dev*, 2006, 27(1): 38–41.
- 郝学财, 余晓斌, 刘志钰, 等. 响应面方法在优化微生物培养基中的应用 [J]. *食品研究与开发*, 2006, 27(1): 38–41.
- [15] Mu Y D. Response surface methodology and its application in food industry [J]. *J Zhengzhou Inst Techn*, 2001, 22(3): 91–94.
- 慕运动. 响应面方法及其在食品工业中的应用 [J]. *郑州工程学院学报*, 2001, 22(3): 91–94.
- [16] Zhao H F, Wei Y M, Dong X N, et al. Optimum conditions of extracting and detecting rutin from stigma maydis by response surface analysis [J]. *Pratac Sci*, 2013, 30(6): 964–972.
- 赵海福, 魏彦明, 董晓宁, 等. 响应面法优化玉米须中芦丁的提取工艺及检测 [J]. *草业科学*, 2013, 30(6): 964–972.
- [17] Zhou D R, Zheng S Q, Jiang J M. Optimization of ultrasonic extraction for flavonoids from loquat flowers with response surface methodology [J]. *Chin J Trop Crops*, 2012, 33(7): 1219–1224.
- 周丹蓉, 郑少泉, 蒋际谋. 响应面法优化枇杷花总黄酮超声波辅助提取工艺的研究 [J]. *热带作物学报*, 2012, 33(7): 1219–1224.
- [18] Bian M N, Li S Z, Bai H J, et al. Optimization of extraction of total flavonoids from *Cabernet sauvignon* leaves by response surface methodology [J]. *Xinjiang Agri Sci*, 2013, 50(11): 2037–2045.
- 边梅娜, 李松泽, 白红进, 等. 响应面法优化赤霞珠葡萄叶总黄酮的提取工艺 [J]. *新疆农业科学*, 2013, 50(11): 2037–2045.
- [19] Jin H, Gao Y, Zeng X D, et al. Optimization of extraction technology of total flavonoids from *Jasminum nudiflorum* Lindl. by response surface methodology [J]. *J Jilin Inst Chem Ind*, 2013, 30(11): 25–28.
- 金华, 高艳, 曾晓丹, 等. 响应面法优化超声波提取迎春花总黄酮工艺的研究 [J]. *吉林化工学院学报*, 2013, 30(11): 25–28.
- [20] Li Y N, Lin Y C, She Z G. Optimization of the extraction technique of *Sargassum fusiforme* polysaccharide via response surface analysis [J]. *J S China Univ Techn (Nat Sci)*, 2004, 32(11): 28–32.
- 李亚娜, 林永成, 余志刚. 响应面分析法优化羊栖菜多糖的提取工艺 [J]. *华南理工大学学报: 自然科学版*, 2004, 32(11): 28–32.
- [21] Liu Y, Zhao M M, Yang N, et al. Optimization of the extraction technique of *Opuntia* polysaccharides via response surface method [J]. *Food Machin*, 2006, 22(6): 42–44.
- 刘洋, 赵谋明, 杨宁, 等. 响应面分析法优化仙人掌多糖提取工艺的研究 [J]. *食品与机械*, 2006, 22(6): 42–44.
- [22] Zhang Z Q, Song Y, Liu X. Optimization of protein extraction from prickly ash seed by response surface methodology [J]. *J Nucl Agri Sci*, 2013, 27(7): 988–995.
- 张志清, 宋燕, 刘翔. 响应面法优化提取花椒籽蛋白质工艺研究 [J]. *核农学报*, 2013, 27(7): 988–995.
- [23] Zhang D S, Zhang F L, Yu Y J, et al. Purple cabbage breeding [J]. *J Changjiang Veget*, 2008(18): 14–17.
- 张德双, 张凤兰, 余阳俊, 等. 紫色大白菜育种思路初探 [J]. *长江蔬菜*, 2008(18): 14–17.
- [24] Liu J, Wang W H, Zhang D S, et al. Primary mapping of *pur*, a gene controlling purple leaf color in *Brassica rapa* [J]. *Acta Agri Boreali-Sin*, 2013, 28(1): 49–53.
- 刘瑾, 汪维红, 张德双, 等. 控制白菜叶片紫色的 $pur$ 基因初步定位 [J]. *华北农学报*, 2013, 28(1): 49–53.

- [25] Li C X, Zhang L G, Sun X L, et al. Optimization of extracting process of anthocyanidin in purple pakchoi [J]. *J NW Agri For Univ (Nat Sci)*, 2011, 39(9): 200–206.  
李长新, 张鲁刚, 孙希禄, 等. 紫色小白菜中花青素的提取工艺优化 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2011, 39(9): 200–206.
- [26] Wrolstad R E, Durst R W, Lee J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products [J]. *Trend Food Sci Techn*, 2005, 16(9): 423–428.
- [27] Wang Q B, Chen G L. *Food Colorants and Its Analysis Method* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 136–153.  
王清滨, 陈国良. *食品着色剂及其分析方法* [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 136–153.
- [28] Zhang Q A, Zhang Z Q, Yue X F, et al. Response surface optimization of ultrasound-assisted oil extraction from autoclaved almond powder [J]. *Food Chem*, 2009, 116(2): 513–518.
- [29] Li Y Y, Chen J Y, Wen F Y, et al. Ultrasound-assisted extract of water-soluble polysaccharides from *Phyllanthus emblica* [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2010, 18(5): 552–558.  
李永裕, 陈建烟, 温凤英, 等. 应用超声波技术强化提取余甘多糖 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2010, 18(5): 552–558.
- [30] Shi E H, Li H, Gu M C, et al. Optimization of technology for polyphenols extraction of *Castanea mollissima* Blume using response surface analysis [J]. *J Chin Inst Food Sci Techn*, 2013, 13(5): 69–76.  
石恩慧, 李红, 谷明灿, 等. 响应面法优化超声提取板栗总苞多酚工艺条件 [J]. *中国食品学报*, 2013, 13(5): 69–76.
- [31] Wang W, Wang N, He G Q, et al. The mulberry pigment extraction condition optimization based on response surface method [J]. *J Chin Inst Food Sci Techn*, 2011, 11(1): 152–158.  
王伟, 王楠, 何国庆, 等. 基于响应面优化法的桑椹色素提取条件优化 [J]. *中国食品学报*, 2011, 11(1): 152–158.